



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬科学）
報告番号	甲第1581号
学位記番号	第323号
氏名	天野 祐一
授与年月日	平成 29 年 3 月 24 日
学位論文の題名	コンフォメーション変換を用いた LSD1 阻害ペプチドの機能制御：刺激応答性リンカーの開発と機能評価
論文審査担当者	主査： 中川 秀彦 副査： 樋口 恒彦，中村 精一，佐藤 匡史，梅澤 直樹

学位論文要旨

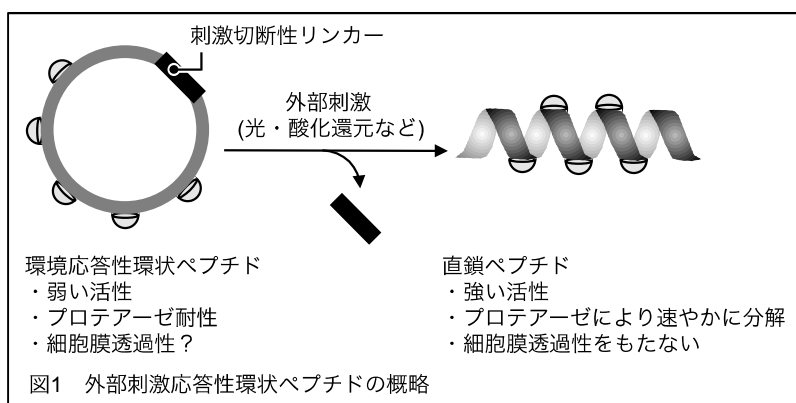
コンフォメーション変換を用いた LSD1 阻害ペプチドの機能制御： 刺激応答性リンカーの開発と機能評価

天野 祐一

ペプチドは、酵素活性の阻害・核酸の選択的認識による転写活性の制御・タンパク質間相互作用の阻害・抗菌活性など、多彩な生理活性をもつ魅力的な分子である。ペプチドは、有機小分子では制御が困難なタンパク質間相互作用阻害能を示すため、化学ツールや医薬品として期待されている。光や酸化還元などの刺激により生理活性をコントロールできるペプチドは、化学ツールとして大きな可能性をもつ。光を用いて生理活性をコントロールできるペプチドは、ケージドペプチドと呼ばれ、生命科学研究に重要な役割を果たしている。外部刺激で活性をコントロールできるペプチドは、プロドラッグとして、副作用の低減などペプチド医薬への貢献が期待できる。

私は、外部刺激によるペプチド活性制御法を提案している。図1に概略を示すが、「刺激切断性リンカーを導入した環状ペプチド」が外部刺激に応答して活性化できるというものである。ペプチドを環状化することで、活性コンフォメーションが取れなくなり、活性が低下する。外部刺激により環状→直鎖状の構造変化が起きると、活性コンフォメーションがとれるようになり、生理活性が回復する。本設計に基づき、光応答性マトリックスメタロプロテアーゼ-3 (MMP-3) 阻害ペプチドの開発に成功している。光切断性リンカーを導入した環状ペプチドは、非常に弱い阻害活性を示したが、光照射により環状→直鎖状の構造変換が起き、約 50 倍の活性上昇が見られた。本手法は、原理的にあらゆる配列のペプチドを制御できると期待される。だが、光活性化後のペプチド中に、光切断性リンカー由来のかさ高い構造が残るため、直鎖ペプチドの活性が低下する点が問題点として残っている。

ペプチドは化学ツールや医薬品として大きな可能性を有する分子であるが、プロテアーゼにより速やかに代謝・分解される、細胞膜を透過しないため細胞内をターゲットにする



ことが困難、という問題点がある。上述した光応答性 MMP-3 阻害ペプチドの研究では、環状化を「活性のスイッチ」としてのみ用いたが、環状化により「代謝安定性」、「細胞膜透過性」の向上も期待できる。環状ペプチドの多くは、直鎖ペプチドと比し、プロテアーゼによる分解に対し耐性を示す。また、ある種の環状ペプチドは、細胞膜透過性を示すことが知られている。本研究では、活性を有さない環状ペプチドの状態では細胞内に送達し、外部刺激により標的細胞内で生理活性を発現させることを目的とした。とくに、刺激切断性リンカー由来の構造を、直鎖ペプチド中にできるだけ残さないリンカーを開発し、活性化後のペプチドが本来の機能を発揮できることをめざした。

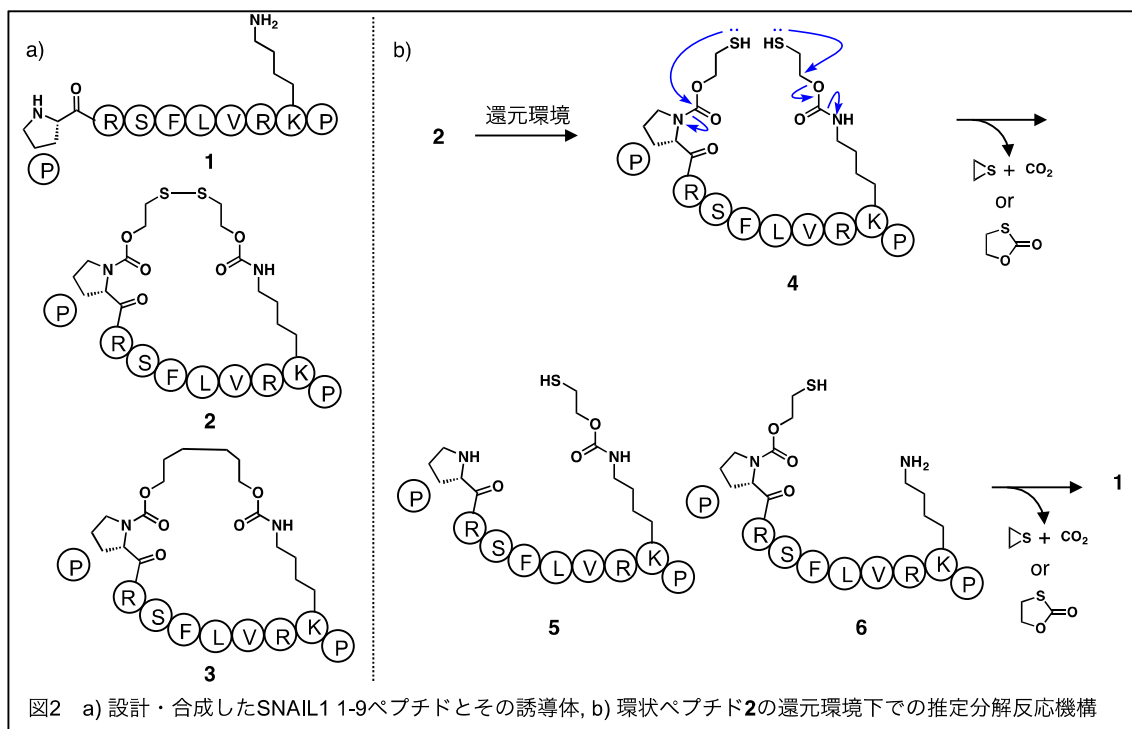
本研究では、リシン特異的脱メチル化酵素 LSD1 を阻害するペプチドを対象とする。LSD1 は、補酵素 FAD と協働してヒストン H3 の 4 残基目のモノ-またはジ-メチル化リシンを酸化的に脱メチル化する酵素である。LSD1 を対象とした理由は、LSD1 とペプチド基質(ヒストン H3 や SNAIL1) との複合体の結晶構造解析が報告されていること、LSD1 はがん細胞で過剰発現しており、その阻害剤はがんの治療薬として期待されていること、の 2 つである。また、LSD1 は細胞内に存在する酵素であり、細胞膜透過性の評価にも適している。選択した LSD1 阻害ペプチド配列は、9 アミノ酸からなる SNAIL1 1-9 (PRSFVLRKP) 及び 20 アミノ酸からなるヒストン H3 K4M 1-20 (ARTMQTARKSTGGKAPRKQL) の 2 種である。

1. 還元環境応答性 SNAIL1 ペプチドの開発

LSD1 は細胞内に存在するため、細胞内で活性化できることが望まれる。そこで、SNAIL1 1-9 を用いて、還元環境応答型 LSD1 阻害ペプチドの開発を行った。細胞内は、細胞外と比べ、グルタチオンをはじめとするチオールが高濃度に存在するなど還元的環境である。そのため、ジスルフィド結合は細胞外では安定であるが、細胞内では切断され、チオールに還元されると考えられる。そこで、ジスルフィド結合を有し、切断後にリンカー由来の構造をペプチド上に残さない「無痕跡型」リンカーを用いることとした。

設計・合成したペプチドを図 2a に示す。ペプチド **1** は SNAIL1 1-9 配列であり、強い LSD1 阻害活性を持つことが知られている直鎖ペプチドである。ペプチド **2** はジスルフィド結合を含むリンカーを導入した還元環境応答型環状ペプチドである。ペプチド **2** に導入されているリンカーは還元環境切断性であり、切断後にリンカー由来の部分構造をペプチド上に残さない「無痕跡型」のリンカーである。ペプチド **2** の推定切断機構を図 2b に示す。還元環境下で、ジスルフィド結合が切断されてチオールを与えた後、分子内反応が起こる。反応機構は 2 通り提案されているが、いずれもリンカー由来の構造は完

全に脱離して直鎖ペプチド **1** に変換されると期待される。ペプチド **3** は、ジスルフィド結合をもたないリンカーを導入した環状ペプチドであり、還元環境応答性を示さないコントロールペプチドである。



設計したペプチドは、Fmoc 固相合成法により合成した。環状ペプチド **2, 3** は、リンカーを導入するアミノ基の保護基を選択的に脱保護した後、固相上でリンカーの導入と環状化を同時に行った。合成したペプチドは逆相 HPLC を用いて精製した。

還元剤 TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine) 存在下、HPLC を用いてペプチド **2, 3** の反応を追跡した。図 3a に示すように、ペプチド **2** は反応時間依存的に分解が進行した。各ピークを分取して、MALDI-TOF-MS を用いた質量分析を行なったところ、図 3a に示す化合物に由来する分子量が観測された。すなわち、環状ペプチド **2** のジスルフィド結合は速やかに切断されてチオールとなること、推定反応機構を経由して直鎖ペプチド **1** を与えること、約 3 時間で直鎖ペプチド **1** に変換されること、が明らかとなった。ペプチド **2** は、TCEP が存在しない条件では、分解が認められなかった。また、コントロールペプチド **3** は、TCEP 存在下、5 時間後も分解は見られず安定であった。

合成したペプチドの *in vitro* 阻害活性を、表 1 に示す。環状ペプチド **2** 及び **3** は、予想通り、直鎖ペプチド **1** より低活性を示した。しかし、類似した環状構造をもつにも関わらず、ペプチド **2** はペプチド **3** よりも、約 10 倍強い活性を示した。アッセイに用い

た LSD1 は調製時に還元剤 DTT を使用している。そのため、残存する DTT によるペプチド **2** から **1** への変換の可能性が考えられた。そこで、DTT を含有しない LSD1 を用いたところ、ほぼ同程度の阻害活性を示し、残存する DTT の影響ではないことが明らかとなった。リンカー中のジスルフィド構造がアッセイに影響を及ぼす可能性を考え、リンカー構造 bis(2-hydroxyethyl) disulfide の活性を評価したが、全く活性を示さなかった。

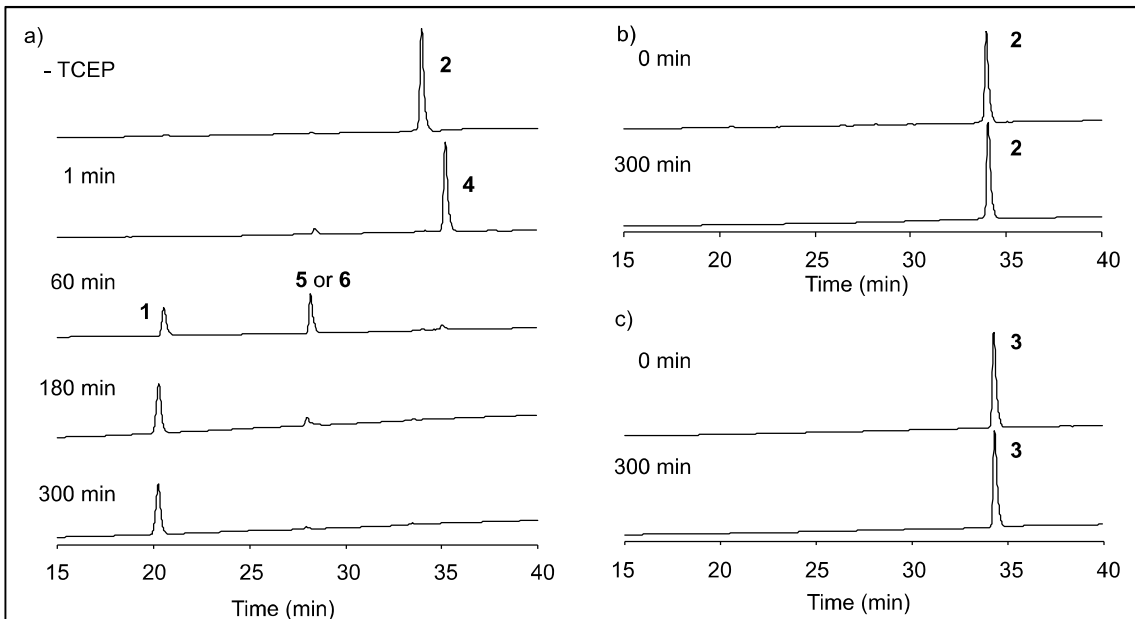


図3 a) 還元剤TCEP存在下の**2**の反応, b) TCEP非存在下の**2**の反応, c) TCEP存在下の**3**の反応

表1 合成したペプチドのLSD1阻害活性

ペプチド	還元剤	K_i (μ M)
1	-	1.9 ± 0.2
2	-	44 ± 10
3	-	>300
2 ^a	-	37 ± 8
3 ^a	-	>300
2	+ ^b	1.6 ± 0.1

^a DTT を含まない LSD1 を用いた。 ^b TCEP で処理した後、HPLC で TCEP を除いた。

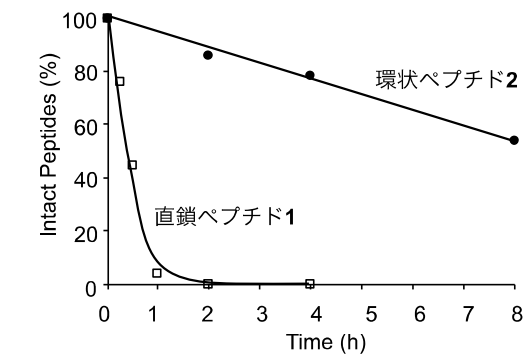


図4 ペプチドのαキモトリプシンに対する安定性

以上の結果より、リンカー構造のわずかな差異が原因で、ペプチド **2** がペプチド **3** よりも強い活性を示すと考えられる。続いて、ペプチド **2** の活性が、還元剤存在下で向上するか検討した。本評価系は、LSD1 が触媒する脱メチル化反応で生成する H_2O_2 を定量するため、過剰の還元剤 (TCEP, DTT, 2-mercaptoethanol) はアッセイ系に影響を与える。そこで、ペプチド **2** に TCEP を添加したサンプル (37 °C, 4.5 時間) を HPLC で精製して、過剰の還元剤を除去した。還元生成物の活性は、ペプチド **2** よりも約 20 倍強く、

直鎖ペプチド **1** と同等であった。この結果は、環状→直鎖状の構造変換が生理活性のスイッチとして機能したこと、刺激切断性リンカーが完全に脱離したこと、を示す。

環状ペプチドの多くは、直鎖ペプチドと比し、プロテアーゼによる分解に対し耐性を示すことが知られている。代表的プロテアーゼとして α キモトリプシンを選択し、ペプチド **1** 及び **2** の安定性を評価した。 α キモトリプシンは、セリンプロテアーゼの一種で、芳香族または疎水性アミノ酸の C 末側を加水分解する酵素である。環状ペプチド **2** は、直鎖ペプチド **1** よりも、大幅にプロテアーゼに対する安定性が向上しており、環状化を用いることで、プロテアーゼに対し耐性をもたせることができた (図 4)。

最後に、細胞膜透過性を検証する目的で、LSD1 を過剰発現したヒト白血病細胞株 HL-60 に対する細胞増殖阻害活性を検討した。だが、ペプチド **1**, **2**, **3** 全てが、活性を示さなかった。本結果はペプチド **2** が十分な細胞膜透過性を示さなかったことを示唆する。

2. 新規 LSD1 阻害ヒストン H3 K4M 1-20 ペプチドの開発

私は新規光切断性リンカーの開発を進めた。開発したリンカーを強力な LSD1 阻害ペプチド H3 K4M 1-20 に導入することで、光応答性 LSD1 阻害ペプチドの開発をめざした。開発した光切断性リンカーは、光照射後、部分構造をわ

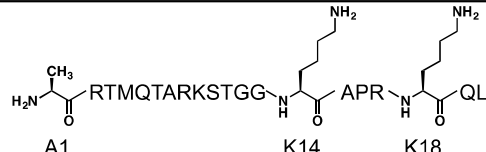
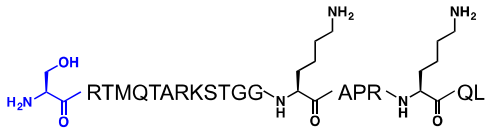
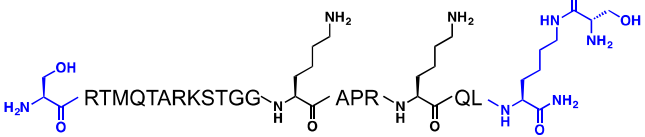
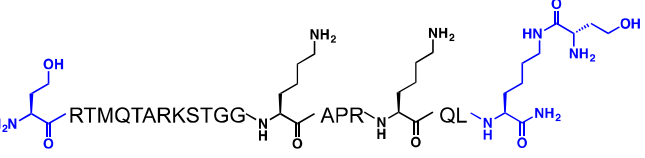
		K_i (μ M)
7		0.098 ± 0.02
8		0.030 ± 0.02
9		0.060 ± 0.02
10		6.3 ± 0.5

図5 H3 K4M 1-20ペプチドとその誘導体の構造とLSD1阻害活性

ずかにペプチド鎖上に残すため、適切なリンカー導入部位を特定する必要がある。種々の H3 K4M 誘導体を合成し LSD1 阻害活性を検討したところ、H3 K4M よりも 10 倍強い活性をもつ新規ペプチドを見出した。

代表的なペプチドの構造と LSD1 阻害活性 K_i を図 5 に示す。開発したリンカーは、光切断後にヒドロキシ基を与えるため、種々のヒドロキシ基をもつ H3 K4M 誘導体を

合成した。誘導体のほとんどがペプチド **7** (H3 K4M 1-20) よりも弱い活性を示したが、N 末端にセリンを導入したペプチド **8** 及び **9** が非常に強い阻害活性を示すことが明らかとなった。ペプチド **9** が示す強い阻害活性の原因を明らかにする目的で、ペプチド **9** が結合した LSD1・CoREST (CoREST : LSD1 と複合体を形成するタンパク質) の X 線結晶構造解析を行った。その結果、LSD1 の Asp555 とペプチド **9** の Ser1 との間に水素結合が見られた。ペプチド **8** 及び **9** の強い阻害活性は、この水素結合に起因すると考えられる。Ser1 の側鎖水酸基の最適な位置を明らかにする目的で、Ser1 をホモセリンに置換したペプチド **10** を合成・活性評価したところ、ペプチド **9** よりも 100 倍活性が低下した。ペプチド **10** が結合した LSD1・CoREST の結晶構造解析も行ったところ、ホモセリン側鎖水酸基と LSD1 の Asp555 との水素結合は見られたものの、ペプチド **7** 及び **9** で見られた Thr3 (ペプチド) と Asp555 (LSD1) との水素結合が消失していることが明らかとなった。

3. 新規光切断性リンカーの開発

新規光切断性リンカーを含む 3 種のリンカー開発を進めた。これらの光切断性リンカーは、リンカー構造の大部分が脱離し、わずかな構造のみをペプチドに残すため活性への影響を小さく抑えることが期待される。リンカーを含む環状ペプチドを合成し、増感剤の存在下で光照射すると、予想された生成物である直鎖状ペプチドが得られた。

(謝辞)

LSD1 阻害活性評価および X 線結晶構造解析を行なって頂きました、理化学研究所・梅原崇史博士に深く感謝いたします。

(基礎となる報文)

1. Y. Amano, N. Umezawa, S. Sato, H. Watanabe, T. Umehara, T. Higuchi

Activation of lysine-specific demethylase 1 inhibitor peptide by redox-controlled cleavage of a traceless linker

Bioorganic & Medicinal Chemistry, **2017**, 25, 1227-1234.

2. Y. Amano^{*}, M. Kikuchi^{*}, S. Sato, S. Yokoyama, T. Umehara, N. Umezawa, T. Higuchi

Development and crystallographic evaluation of histone H3 peptide with N-terminal serine substitution as a potent inhibitor of lysine-specific demethylase 1

Bioorganic & Medicinal Chemistry (in press, accepted in 8th March 2017, ^{*}: these authors equally contributed to this paper)